شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۶، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲
صفحات ۶۲۵-۶۱۱

تغذیه با سطوح مختلف کانولای تخمیرشده با *Bacillus* sp. رسوبات دریای خزر بر شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و متابولیکی کبد ماهیان انگشت قد تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)

امیر حسن‌خانی[۱]، احمد ایمانی[۲*]، مجتبی محسنی[۳]، نیما شیخ‌بگلو[۴]

۱. فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. دانشیار گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۴. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۷

چکیده

تولید خوراک اقتصادی و استفاده از نهاده‌های اولیه در دسترس، نقش مهمی در توسعهٔ پایدار صنعت آبزی‌پروری ایفا می‌کند. چنین ضرروتی سبب توجه ویژه به مواد خوراکی محلی و استفاده از روش‌های مختلف زیست‌فناورانه برای بهبود کیفیت آن‌ها شده است. مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی اثر سطوح مختلف جیره‌ای کانولای تخمیرشده با باکتری جنس باسیلوس رسوبات دریای خزر بر شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و متابولیکی کبد بچه‌ماهیان تیلاپیای نیل انجام گرفت. ۲۲۵ قطعه بچه‌ماهی با میانگین وزنی ۰/۰۵±۱/۹ گرم با ۵ خوراک آزمایشی شامل تیمار ۱ (شاهد)، خوراک بدون کانولای تخمیرشده، تیمار ۲، خوراک حاوی ۱۲/۵ درصد کانولای تخمیرشده، تیمار ۳، خوراک حاوی ۲۵ درصد کانولای تخمیرشده، تیمار ۴، خوراک حاوی ۳۷/۵ درصد کانولای تخمیرشده و تیمار ۵، خوراک حاوی ۵۰ درصد کانولای تخمیرشده، به‌مدت ۸ هفته تغذیه شدند. شاخص‌های رشد تیمارهای مختلف آزمایش تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P>0/05$). نتایج فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد نشان داد که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در تیمار ۴ و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) در تیمارهای ۳ و ۴ در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت ($P<0/05$). فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بین تیمار شاهد با سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P>0/05$)، اما بین تیمارهای ۳ و ۴ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P<0/05$). همچنین نتایج فعالیت آنزیم‌های متابولیکی کبد ماهیان نشان داد که فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) در تیمارهای ۲، ۳ و ۴ و همچنین فعالیت آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در تیمار شاهد با سایر تیمارهای آزمایشی دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P<0/05$). به‌طور کلی می‌توان چنین نتیجه گرفت که استفاده از ۵۰ درصد کانولای تخمیرشده در خوراک بچه‌ماهیان انگشت‌قد تیلاپیای نیل بدون اثر منفی بر شاخص‌های رشد امکان‌پذیر است.

واژگان کلیدی: کانولا، شاخص‌های رشد، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و متابولیکی، ماهی تیلاپیای نیل

* نویسنده مسئول: احمد ایمانی
Email: a.imani@urmia.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 76, No. 4, Winter 2024
pp. 611-625

Effect of feeding various dietary levels of fermented canola meal with *Bacillus* sp. from the Caspian Sea sediments on growth, liver antioxidative and metabolic enzymes activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings

Amir Hasan Kahni[1], Ahmad Imani[2*], Mojtaba Mohseni[3], Nima Shaykh-Baygloo[4]

1. *M.Sc. graduate, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran*
2. *Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran*
3. *Associate Professor, Department of Microbiology, School of Biosciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran*
4. *Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran*

Received: 18-Jan-2023 **Accepted: 16-Feb-2023**

Abstract

Producing cost-effective aquafeed and using very available feed ingredients play an important role in sustainable aquaculture development. Such an undeniable necessity has resulted in special attention to local feed ingredients and application of biotechnological solutions to improve the ingredients. The present study was carried out to investigate the effect of various dietary contents of fermented canola meal with *Bacillus* sp. from sediments of the Caspian Sea on growth, liver antioxidative and metabolic enzymes activity of Nile tilapia fingerlings. 225 fish with an average weight of 1.9±0.05 g were fed five different experimnetal diets including, treatment 1 (control group): diet without fermented canola meal, treatment 2, diet containing 12.5% fermented canola meal, treatment 3, diet containing 25% fermented canola meal, treatment 4, diet containing 37.5% fermented canola meal and treatment 5, diet containing 50% fermented canola meal, for 8 weeks. Results revealed that the growth indices did not significantly differ among various experimental groups ($p>0.05$). Liver antioxidative enzymes activity showed that activity of SOD in treatment 4, and activity of GPX in treatments 3 and 4 increased compared to the control group ($p<0.05$). Although, activity of CAT did not significantly differ among various experimental groups ($p>0.05$), significant difference was observed between treatments 3 and 4 in this regard ($p<0.05$). Also, liver metabolic enzymes activity showed that AST activity of treatments 2, 3 and 4, and ALT activity of treatments 2, 3, 4 and 5 increased in comparison to control group ($p<0.05$). In general, it was concluded that incorporating 50% of fermented canola meal did not affect growth indices of Nile tilapia fingerlings.

Keywords: Canola, Growth indices, Antioxidant and Metabolic enzymes, Nile tilapia

∗ Corresponding author: Ahmad Imani Email: a.imani@urmia.ac.ir

۱. مقدمه

پرورش ماهی تیلاپیا به‌دلیل سازگاری بالای این گونه ماهی به شرایط مختلف محیطی و سرعت رشد بالای آن، تغذیه و رشد مطلوب با خوراک کیفیت پایین، انتخاب مناسبی جهت توسعهٔ آبزی‌پروری محسوب می‌شود. همچنین گونه‌های تیلاپیا بعد از جذب کیسهٔ زرده توانایی پذیرش غذای دستی را دارند، که سبب تسهیل پرورش آن‌ها می‌گردد (El-sayed, 2006). ماهی تیلاپیا بویژه تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) رتبهٔ دوم را در میان گونه‌های رایج در آبزی‌پروری دارد. چین بزرگترین کشور تولیدکنندهٔ تیلاپیا با سهمی بالغ بر ۵۰٪ کل تولیدات جهانی به‌شمار می‌رود (FAO, 2016). برخلاف آزاد ماهیان که خوراک آن‌ها حاوی سطوح بالای چربی و پروتئین است (Pourahad-Anzabi *et al*., 2023)، تیلاپیا با داشتن عادت غذایی گیاه‌خواری و همه‌چیزخواری با جیرهٔ حاوی فیبر و کربوهیدرات بالا نیز دارای رشد مطلوب و اقتصادی است. میزان کربوهیدرات خوراک ماهی تیلاپیا می‌تواند تا ۲۰ الی ۴۰ درصد افزایش یابد، با این‌حال فیبر خوراک نباید از ۵ درصد فزونی یابد (Lucas *et al*., 2019).

آگاهی از دانش تغذیهٔ آبزیان، از جمله مواد مغذی مورد نیاز بدن و قابلیت هضم مواد خوراکی امری حیاتی است. شناخت نیازهای غذایی و فیزیولوژی تغذیهٔ گونه‌های آبزی پرورشی و تولید خوراک پایدار با یکدیگر مرتبط بوده و از نظر محیط‌زیستی و اقتصادی ضروری است. شناسایی مواد خوراکی در دسترس و همچنین اقتصادی به‌همراه بهبود قابلیت‌گوارش و جذب مواد مغذی نقش مهمی در توسعهٔ پایدار صنعت خوراک آبزیان دارند (Mahmoudikiya and Imani, 2023). با توجه به اینکه ماهیان همه‌چیزخوار رودهٔ طولانی دارند، مواد غذایی به‌سرعت از آن عبور می‌کنند. بنابراین باید قابلیت هضم مواد غذایی بالا بوده و همچنین جذب و دسترسی به آن‌ها راحت باشد. این مهم فقط با مدیریت جیره و ساخت مناسب‌ترین خوراک از لحاظ ماتریس و قابلیت هضم مناسب فراهم می‌شود (Lucas *et al*., 2019).

با توجه به ضرورت افزایش تولید آبزیان به‌ویژه به کمک روش‌های پرورش متراکم آبزیان که وابسته به غذای دستی است، یافتن منابع پروتئینی گیاهی مناسب یک ضرورت اجتناب‌ناپذیر تلقی می‌شود (Mohammadi *et al*., 2020). در این بین، کنجاله‌های حاصل از دانه‌های روغنی به‌علت تولید بالای جهانی و قیمت پایین، گزینهٔ مناسب‌تری محسوب می‌شوند (Mwachireya *et al*., 1999). به‌دلیل ارزان قیمت بودن کنجالهٔ کانولا نسبت به سایر منابع پروتئین حیوانی و گیاهی، می‌توان از این نهادهٔ اولیه در خوراک دام، طیور و آبزیان استفاده نمود. از مزایای کنجالهٔ کانولا محتوای بالای پروتئینی آن، در دسترس بودن و همچنین قیمت پایین آن است (Mohammadi *et al*., 2020). اسیدهای آمینه موجود در کانولا نسبت به پروتئین‌های گیاهی دیگر بالاتر بوده و از قابلیت هضم بالایی نیز برخوردار هستند (Turchini *et al*., 2009). متیونین و سیستئین کانولا در مقایسه با منابع پروتئینی گیاهی دیگر بالاتر بوده، همچنین دارای مقادیر بالای کولین، بیوتین، اسیدفولیک، نیاسین، ریبوفلاوین و تیامین است (Lim *et al*., 2008; Enami, 2011). از عمده مشکلات استفاده از کانولا در خوراک آبزیان، داشتن مواد ضدتغذیه‌ای و میزان بالای اسید اروسیک و گلوکوزینولات است (Lim *et al*., 2008). گلوکوزینولات و مشتقات آن باعث کاهش رشد، اختلال در اعمال فیزیولوژیکی ماهیان به‌ویژه عملکرد غده تیروئید می‌شود (Francis *et al*., 2011). از طرفی، کنجالهٔ کانولا مانند دیگر دانه‌های روغنی دارای ترکیبات فنولی، الیاف و اسید فایتیک می‌باشد. اسید فایتیک یک ترکیب فسفاتی است که برای حیوانات تک معده‌ای از جمله ماهی‌ها قابل جذب نبوده و به‌عنوان یک مادهٔ ضد تغذیه‌ای به‌شمار می‌رود (Mohseni *et al*., 2018). این ترکیب با اتصال به پروتئین و مواد معدنی از دسترسی زیستی و نیز قابلیت هضم آن‌ها می‌کاهد (Liu *et al*., 1998). حیوانات تک معده‌ای از جمله آبزیانی چون تیلاپیا و همچنین گونه‌های بدون معده به‌دلیل نداشتن آنزیم فیتاز، قادر به استفاده از فسفر

فیتاتی نیستند (Lim *et al*., 2008). در مطالعهٔ Mohseni و Malekpour در سال ۲۰۱۹، استفادهٔ بیش از ۲۰ درصد کنجالهٔ کانولا به‌جای پودر ماهی در خوراک تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) اثر سوئی بر عملکرد رشد، قابلیت هضم و پارامترهای خونی این ماهی داشت. همچنین Zhou و همکاران (۲۰۱۸) افزودن حداکثر ۵۰ درصد کنجالهٔ کانولا در خوراک ماهی سیم (*Megalobrama amblycephala*) را توصیه کردند. البته مشخص شده است که افزودن آنزیم فیتاز به خوراک، می‌تواند بخش قابل توجهی از فسفر فیتاتی را در دسترس ماهیان قرار دهد، که در بهبود کیفیت خوراک و قابلیت هضم مواد مغذی مؤثر است. طی مطالعاتی استفاده از مکمل فیتاز به خوراک باعث افزایش قابلیت هضم فیتات و دسترسی به مواد معدنی در گربه‌ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) شد (Rodehutscord and Pfeffer, 1995; Li and Robinson, 1997). در این بین استفاده از آنزیم فیتاز تولیدشده توسط گونه‌های باکتری باسیلوس با توجه به مقاومت بالا نسبت به محدودهٔ گستردهٔ pH و دما قابل توصیه است. این باکتری‌ها از طیف وسیعی از مواد به‌عنوان منابع مواد مغذی استفاده می‌کنند و به انواع محدودیت‌های محیطی نظیر دما، pH و شوری مقاوم هستند (Alcaraz *et al*., 2010).

طبق بررسی‌های صورت گرفته، تا به امروز پژوهشی مبنی بر استفاده از باکتری باسیلوس جدا شده از بستر دریای خزر که دارای قابلیت تولید فیتاز باشد، به‌منظور کاهش همزمان محتوای فیبر و فیتات کنجالهٔ کانولا انجام نشده است. همچنین از آنجا که آنزیم‌های حاصل از منابع دریایی (مانند باکتری باسیلوس جدا شده از رسوبات دریای خزر) ممکن است از نظر ویژگی‌هایی مانند توانایی سازگاری با دماهای پایین و در نتیجه سهولت استفاده در دماهای محیطی با آنزیم‌های موجودات خشکی‌زی متفاوت باشند، به‌نظر می‌رسد استفاده از آن‌ها در آبزی‌پروری می‌تواند مؤثر واقع گردد. این مطالعه با هدف بررسی امکان کاهش محتوای مواد ضد تغذیه‌ای کنجالهٔ کانولای به‌وسیلهٔ تخمیر آن با باکتری جنس باسیلوس و بررسی حداکثر سطح قابل استفاده از آن به‌جای سایر منابع پروتئینی گرانقیمت مانند کنجالهٔ سویا در خوراک بچه‌ماهیان انگشت‌قد تیلاپیای نیل با تأکید بر شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و متابولیکی کبد انجام گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تخمیر کنجالهٔ کانولا

ابتدا کنجالهٔ کانولا آسیاب شده و ذرات با اندازهٔ کمتر از ۴۰۰ میکرون برای تلقیح و سرانجام تخمیر با باکتری استفاده شد. بدین‌منظور ۵۰ درصد رطوبت به کنجاله اضافه گردید و باکتری باسیلوس جدا شده از رسوبات بستر دریای خزر با توانایی تولید فیتاز که پیش‌تر توسط Mohseni و همکاران (۲۰۱۸) غربالگری و شناسایی شده بود، با تراکم 10^5 cfu.g^{-1} به کانولا افزوده شد. جداسازی باکتری جنس باسیلوس دریایی تولیدکنندهٔ فیتاز شامل کشت نمونه‌های باکتری تهیه‌شده از رسوبات بستر روی محیط کشت نوترینت آگار در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد بود، در نهایت توانایی تولید آنزیم فیتاز جدایه‌ها روی محیط‌های کشت اختصاصی مورد بررسی قرار گرفته بود (Mohseni *et al*., 2018).

در ادامه ارلن‌های حاوی باکتری و کنجاله در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. پس از طی مدت زمان لازم جهت تخمیر، عمل شستشوی کنجاله سه بار با آب مقطر انجام و در نهایت به کمک فشرده‌سازی تا حد امکان رطوبت کنجاله گرفته شد و محصول نهایی در دمای ۱۰۵ درجهٔ سانتی‌گراد با استفاده از آون به‌طور کامل خشک گردید. در این مرحله محتوای مواد ضد تغذیه‌ای آن شامل کل ترکیبات فنلی، تانن، اسید فایتیک، ADF[1] و NDF[2] اندازه‌گیری شدند (جدول ۱). میزان فیتات با استفاده از روش عصاره‌گیری و جذب

[1] Acid Detergent Fiber
[2] Netural Detergent Fiber

نوری به روش De Boland و همکاران (۱۹۷۵) و میزان ADF و NDF کنجالهٔ کانولا قبل و بعد از تخمیر با دستگاه فایبرتک به روش Van Soest و همکاران (۱۹۹۱) سنجش شدند.

جدول ۱. میزان شاخص‌های ضد تغذیه‌ای و تجزیهٔ تقریبی کانولا

شاخص	قبل از تخمیر	بعد از تخمیر
ترکیبات فنلی (٪)	۲/۳۲	۱/۶۳
تانن (٪)	۰/۰۶	۰/۰۳
اسید فایتیک (٪)	۶/۰	۳/۶
ADF (٪)	۲۳/۷	۱۸/۶
NDF (٪)	۲۸/۱	۲۵/۸
پروتئین (٪)	۳۶/۴۴	۳۹/۳۸
چربی (٪)	۸/۹	۹/۲
ماده خشک (٪)	۹۲/۷۲	۹۶/۴۲

۲.۲. ساخت خوراک‌های آزمایشی و شروع دورهٔ پرورش

پس از مشخص شدن اثر تخمیر بر محتوای مواد ضد تغذیه‌ای کنجالهٔ کانولا، خوراک‌های آزمایشی براساس نیازهای غذایی بچه‌ماهی تیلاپیای نیل تنظیم (NRC, 2011) و ساخته شد. همچنین، تجزیهٔ تقریبی خوراک و اجزای تشکیل‌دهندهٔ آن (پروتئین، چربی، خاکستر، رطوبت و انرژی) براساس AOAC (2005) اندازه‌گیری شدند (جدول ۲). پژوهش حاضر در قالب ۵ تیمار و در سه تکرار روی ماهی تیلاپیای نیل تک جنس نر با میانگین وزنی ۰/۰۵±۱/۹ گرم به‌مدت ۸ هفته انجام گرفت. جهت شروع دوره، ۱۵ قطعه ماهی در هرتانک ۱۰۰ لیتری (با ۵۰٪ آب‌گیری) رهاسازی شدند. همچنین با استفاده از بخاری الکتریکی دمای محیط پرورش در ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم و غذادهی ماهیان در طول دورهٔ پرورش در حد سیری انجام گرفت.

۳.۲. محاسبهٔ شاخص‌های رشد

در انتهای دورهٔ پرورش، زیست‌سنجی از ماهیان انجام گرفت و با استفاده از داده‌های به‌دست آمده از وزن نهایی و مقدار غذای خورده شده و براساس روابط زیر شاخص‌های رشد محاسبه شدند (Hamza *et al*., 2008).

(تعداد ماهیان هرتانک / زی‌تودهٔ نهایی هرتانک) = وزن نهایی

۱۰۰×(طول چنگالی به سانتی‌متر)^{۳} / وزن ماهی به گرم = شاخص چاقی

۱۰۰×(وزن ماهی به گرم / وزن کبد ماهی به گرم) = شاخص کبدی

طول دورهٔ پرورش به روز / (وزن اولیه-وزن نهایی) = ضریب رشد روزانه

۱۰۰×(طول دوره پرورش به روز×میانگین دمای دوره به سانتی‌گراد) / ($^{۱/۳}$وزن اولیه- $^{۱/۳}$وزن نهایی) = ضریب رشد دمایی

جدول ۲. اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی مورد استفاده در این پژوهش

مواد خوراکی (٪)	تیمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵
پودر ماهی (کیلکا)	۸	۸	۸	۸	۸
کنجالهٔ سویا	۳۶	۲۷/۳	۱۸/۳	۹/۵	۰/۷
پودر خون	۵	۵	۵	۵	۵
کنجالهٔ کانولا تخمیری	۰	۱۲/۵	۲۵	۳۷/۵	۵۰
مخمر	۵	۵	۵	۵	۵
گلوتن گندم	۵	۵	۵	۵	۵
آرد گندم	۱۵	۱۱/۲	۷/۸	۴/۱	۰/۵
نشاستهٔ ذرت	۵	۵	۵	۵	۵
ملاس	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
روغن ماهی (کیلکا)	۲/۹	۲/۹	۲/۹	۲/۹	۲/۹
روغن سویا	۲/۹	۲/۹	۲/۸	۲/۸	۲/۸
مکمل اسید آمینه	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
مکمل مواد معدنی	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
متیونین	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
ترئونین	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
لیزین	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰/۶
دی‌کلسیم فسفات	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
ویتامین C	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
ویتامین E	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
کولین کلراید	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴
ترکیب شیمیایی خوراک (٪)					
پروتئین خام	۳۸/۰۸	۳۸/۱۱	۳۸/۰۶	۳۸/۰۵	۳۸/۰۷
چربی	۹/۰۱	۹/۰۶	۹/۰۲	۹/۰۷	۹/۰۲
فیبر خام	۳/۲۱	۳/۸۵	۴/۴۸	۵/۱۲	۵/۷۶
خاکستر	۶/۵۵	۶/۸۱	۷/۰۷	۷/۳۲	۷/۶
عصارهٔ عاری از ازت	۴۲/۸۳	۴۱/۳۰	۳۹/۹۳	۳۸/۴۲	۳۶/۹۹
انرژی ناخالص (MJ/kg)	۱۵/۲۶	۱۵/۶۱	۱۵/۹۷	۱۶/۳۳	۱۶/۶۷

۴.۲. سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و متابولیکی کبد

در پایان دورهٔ پرورشی به‌صورت تصادفی از هر تانک یک ماهی (از هر تیمار ۳ قطعه ماهی) انتخاب و با محلول پودر گل میخک با غلظت ۲۵۰ppm بی‌هوش (Akhlaghi and Mirab Brojerdi, 1999) و جهت نمونه‌برداری از بافت کبد، اقدام شد. برای تهیهٔ عصارهٔ خام از بافت کبد، قطعات خردشدهٔ بافتی در بافر Tris HCl با pH ۷/۵ و مولاریته ۰/۰۲۵ با استفاده از هموژنایزر همگن و سانتریفیوژ شدند. سپس سوپرناتانت حاصل برای سنجش محتوای پروتئینی بافت و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و متابولیکی استفاده شد (Mohammadi *et al*., 2020).

در این مطالعه جهت سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از روش غیر مستقیم براساس میزان ممانعت از تشکیل کمپلکس نیترو تترازولیوم استفاده شد. در حضور این آنزیم، میزان تولید رنگ آبی فورمازان کاهش می‌یابد. شدت رنگ ایجادشده در ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیمی به‌عنوان مقدار آنزیمی است که باعث مهار ۵۰ درصدی احیایNBT به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین از بافت هموژنه می‌شود (Mohammadi *et al*., 2020).

جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، ۱/۹۹ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۱۰۰۰ میکرولیتر آب اکسیژینه ۳۰μM به ۱۰ میکرولیتر سوپرناتانت عصارهٔ خام کبد اضافه شد و عملیات جذب آن به مدت ۱۵ و ۶۰ ثانیه قرائت شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر حسب K/sec/mg protein بیان شد (Yazdanparast *et al*., 2008).

برای سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، واکنش با مخلوط کردن ۸۹۰ میکرولیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ mM با pH=۷ حاوی EDTA (۱ mM)، NAN_3 (۱ mM)، NADPH (۰/۲ mM)، گلوتاتیون احیاء (۱ mM)، گلوتاتیون ردوکتاز (۱ U/ml) با ۱۰ میکرولیتر از سوپرناتانت کبد و ۱۰۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید انجام شد. تبدیل NADPH به $NADP^+$ در طول موج ۳۴۰ نانومتر به‌مدت ۳ دقیقه به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. فعالیت آنزیم براساس نانومول از NADPH اکسیدشده به $NADP^+$ در یک دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (Paglia and Valentine, 1967). سنجش فعالیت آنزیم‌های متابولیکی کبد (AST و ALT) نیز با استفاده از کیت‌های سنجش شرکت پارس آزمون و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

۵.۲. تجزیه و تحلیل‌های آماری

پژوهش حاضر به‌صورت یک طرح کاملاً تصادفی ساده انجام شد. برای انجام تجزیه و تحلیل‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۱ و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel نسخهٔ ۲۰۱۳ استفاده شد. همچنین از آزمون‌های کولموگروف-اسمیرنوف و لِوِن به‌ترتیب برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها و همگنی واریانس گروه‌های آزمایشی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای مقایسهٔ میانگین تیمارهای مختلف از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. نتایج به‌صورت "خطای استاندارد ± میانگین" ارائه و حداقل سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۳. نتایج

۱.۳. شاخص‌های رشد

براساس نتایج شاخص‌های رشد (جدول ۳) اختلاف معنی‌داری میان تیمار ۱ (شاهد) و سایر تیمارها مشاهده نشد ($P>0/05$). با این حال بالاترین شاخص‌های وزن نهایی، شاخص کبدی، ضریب رشد روزانه و ضریب رشد دمایی در تیمار ۵ (خوراک حاوی ۵۰ درصد پودر کانولای تخمیرشده) به‌دست آمد ($P>0/05$). همچنین از نظر عددی، بالاترین ضریب چاقی در تیمار ۳ (خوراک حاوی ۳۷/۵ پودر کانولای تخمیرشده) مشاهده شد ($P>0/05$).

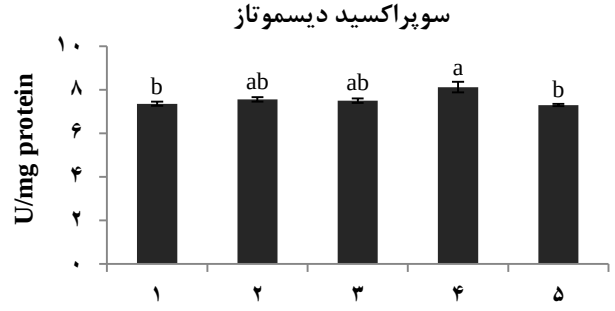
۲.۳. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد

براساس نتایج حاصل، بیشترین فعالیت SOD (شکل ۱) در تیمار ۴ (خوراک حاوی ۳۷/۵ درصد کنجالهٔ کانولای تخمیرشده) مشاهده شد ($P<0/05$). فعالیت این آنزیم در تیمار ۵ (خوراک حاوی ۵۰ درصد کنجالهٔ کانولای تخمیرشده) اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت ($P>0/05$).

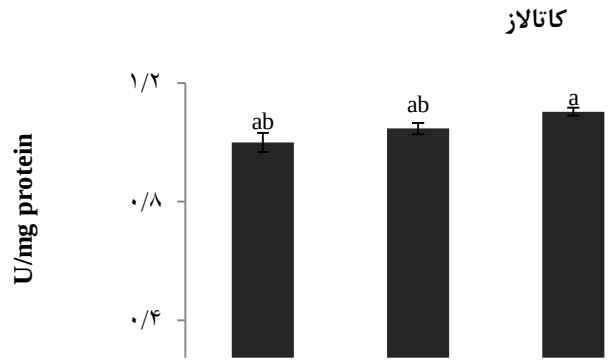
نتایج فعالیت CAT (شکل ۲) اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد با سایر تیمارهای آزمایشی نداشت ($P>0/05$). کمترین و بیشترین فعالیت این آنزیم به‌ترتیب در تیمارهای ۳ (خوراک حاوی ۲۵ درصد پودر کانولای تخمیرشده) و ۵ مشاهده شد. فعالیت این آنزیم بین تیمارهای ۳ و ۵ دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P<0/05$).

جدول ۳- شاخص‌های رشد و تغذیه ماهیان تیمارهای آزمایشی (Mean±SE, n=3)

شاخص / تیمار	۱	۲	۳	۴	۵
وزن اولیه (گرم)	۱/۸۹±۰/۰۵	۱/۹۷±۰/۰۹	۱/۹۷±۰/۱۵	۲/۱۳±۰/۰۸	۱/۸۸±۰/۰۹
وزن نهایی (گرم)	۱۳/۵۹±۰/۵۹	۱۵/۲۳±۰/۳۹	۱۳/۴۶±۰/۲۸	۱۴/۱۳±۱/۶۴	۱۵/۴۱±۰/۷۱
ضریب چاقی (٪)	۲/۳۹±۰/۰۵	۲/۵۱±۰/۱۷	۲/۱۷±۰/۰۹	۲/۲۸±۰/۰۷	۲/۲۳±۰/۰۴
شاخص کبدی (٪)	۲/۳۲±۰/۲۷	۲/۰۳±۰/۴۵	۱/۶۶±۰/۲۳	۱/۸۳±۰/۱۹	۲/۲۶±۰/۲۲
ضریب رشد روزانه (روز/٪)	۷/۶۴±۰/۳۸	۸/۷±۰/۳۱	۷/۵۱±۰/۲۷	۷/۸۴±۱/۰۸	۸/۸۵±۰/۴۶
ضریب رشد دمایی (٪)	۲/۷۳±۰/۱۴	۳/۰۹±۰/۱۱	۲/۶۸±۰/۱	۲/۸±۰/۳۹	۳/۱۶±۰/۱۶



شکل ۱. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) کبد ماهیان تیمارهای مختلف آزمایشی، حروف غیر یکسان نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح $P<۰/۰۵$ است.



شکل ۲. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) کبد ماهیان تیمارهای مختلف آزمایشی، حروف غیر یکسان نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح $P<۰/۰۵$ است.

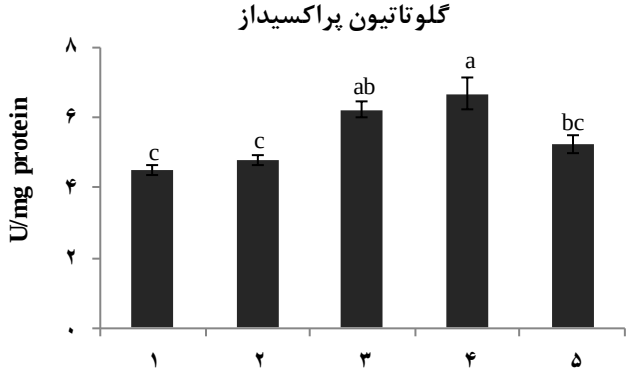
از نظر فعالیت آنزیم GPX (شکل ۳) میان تیمار شاهد و تیمارهای ۳ و ۴ اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). تیمار ۴ با تیمارهای ۲ (خوراک حاوی ۱۲/۵ درصد کنجالهٔ کانولای تخمیرشده) و ۵ نیز دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P<۰/۰۵$). کمترین و بیشترین فعالیت این آنزیم به‌ترتیب در تیمارهای ۱ و ۴ مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

۳.۳. فعالیت آنزیم‌های متابولیکی کبد

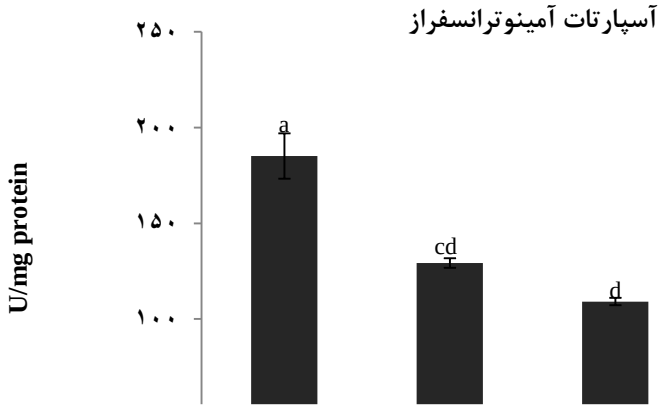
براساس نتایج به دست آمده، فعالیت AST (شکل ۴)

در تیمار شاهد با تیمارهای ۲ (خوراک حاوی ۱۲/۵ درصد کنجالهٔ کانولای تخمیرشده)، ۳ (خوراک حاوی ۲۵ درصد کنجالهٔ کانولای تخمیرشده) و ۴ (خوراک حاوی ۳۷/۵ درصد کنجالهٔ کانولای تخمیرشده) دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P<۰/۰۵$). میان تیمار شاهد و تیمار ۵ (خوراک حاوی ۵۰ درصد کنجالهٔ کانولای تخمیرشده) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). کمترین و بیشترین فعالیت این آنزیم به‌ترتیب در تیمارهای ۳ و ۱ مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

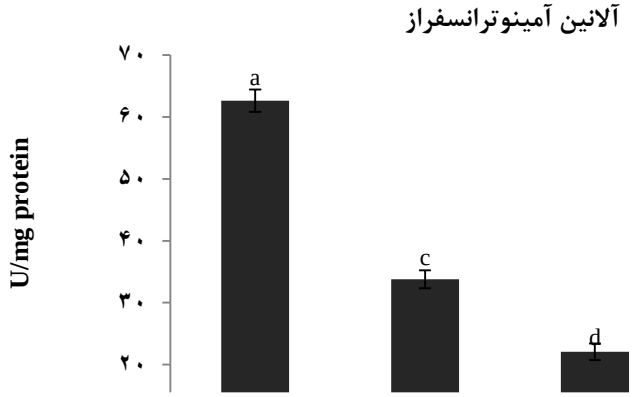
همچنین، از نظر فعالیت ALT (شکل ۵) میان تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$)؛ برای مثال میان تیمارهای ۲ و ۴ با تیمارهای ۳ و ۵، و بین تیمار ۳ با تیمار ۵ اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). کمترین و بیشترین فعالیت این آنزیم به‌ترتیب در تیمارهای ۳ و ۱ مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).



شکل ۳. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) کبد ماهیان تیمارهای مختلف آزمایشی، حروف غیر یکسان نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح $P<۰/۰۵$ است.



شکل ۴. فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) کبد ماهیان تیمارهای مختلف آزمایشی، حروف غیر یکسان نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح $P<۰/۰۵$ است.



شکل ۵. فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) کبد ماهیان تیمارهای مختلف آزمایشی، حروف غیر یکسان نشان‌دهندهٔ اختلاف آماری معنی‌داری در سطح $P<0/05$ است.

۴. بحث

نتایج مربوط به شاخص‌های رشد در مطالعهٔ حاضر نشان داد که استفاده از ۵۰ درصد کنجالهٔ کانولای تخمیرشده اثری بر این شاخص‌ها نداشت. این نتایج با برخی یافته‌های مطالعات پیشین در مورد افزودن منابع گیاهی به خوراک ماهیان مطابقت دارد. نتایج مطالعهٔ Burel و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که افزودن کنجالهٔ کانولا به خوراک بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تا ۳۰ درصد اثر منفی بر شاخص‌های رشد نداشت. استفاده از کنجالهٔ سویا در خوراک بچه‌ماهیان کپور طلایی دورگه (*Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*) نیز اثری بر شاخص‌های کبدی و ضریب چاقی تیمارهای مختلف آزمایشی نداشت (Zhu *et al*., 2020). البته در این مطالعات سطوح بالاتر منابع گیاهی باعث اختلال در عملکرد رشد ماهیان مورد مطالعه شد. در مطالعهٔ Przybyl و همکاران (۲۰۰۶) افزودن کنجالهٔ کانولا و سویا تا سطح ۵۰ درصد به خوراک تاس‌ماهیان استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) امکان‌پذیر بود و در سطوح بالاتر منجر به کاهش رشد ماهیان شد. استفاده از کنجالهٔ سویا در خوراک ماهیان تیلاپیای دورگه (*Orechromis niloticus* × *Orechromis aureus*) نیز اثری بر شاخص کبدی و وضعیت چاقی نداشت، اما در سطوح بالاتر منجر به کاهش وزن نهایی ماهیان شد (Lin and Luo, 2011). پیشتر نیز عنوان شد که استفاده از کنجالهٔ کانولا در خوراک ماهیان به‌واسطهٔ داشتن ترکیبات ضد تغذیه‌ای از جمله تانن، فیبر و فیتات دارای محدودیت است (Francis *et al*., 2001). این در حالی است که نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از کانولای تخمیرشده در سطح ۵۰ درصد علاوه بر اینکه اثر منفی بر شاخص‌های رشد بچه‌ماهیان تیلاپیای نیل نداشت، سبب بهبود برخی شاخص‌ها نیز گردید. نتایج مطالعهٔ Yamamoto و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که افزودن کنجالهٔ کانولای تخمیرشده با باکتری جنس باسیلوس در خوراک بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان اثری بر شاخص‌های رشد نداشت. استفاده از کنجالهٔ پنبهٔ هیدرولیز شده در خوراک ماهی سیم وچانگ (*Megalobrama amblycephala*) در مطالعهٔ Yuan و همکاران (۲۰۱۹) اثری بر شاخص‌های ضریب رشد روزانه و ضریب رشد دمایی ماهیان نداشت. همچنین، نتایج پژوهش Plaipetch و Yakupitiyage (۲۰۱۲) نشان داد که استفاده از کنجالهٔ کانولای تخمیرشده توسط مخمر نانوایی در خوراک تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) نظیر مطالعه حاضر منجر به کاهش عوامل ضدتغذیه‌ای کانولا

شده و بر شاخص‌های رشد ماهیان اثر منفی نداشت. تخمیر کنجالهٔ کانولا توسط گونه‌های باکتری باسیلوس با توجه به مقاومت نسبت به محدودهٔ گستردهٔ pH و دما، جهت کاهش مواد ضدتغذیه‌ای و ترکیبات فیبری توصیه شده است (Alcaraz *et al*., 2010). استفاده از تخمیر میکروبی در خوراک حاوی منابع گیاهی باعث به حداکثر رسیدن قابلیت هضم و افزایش رشد و جذب پروتئین، فسفر، کلسیم و منیزیم در ماهیان تیلاپیای نیل می‌شود (Portz and Liebert, 2004).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد ماهیان مطالعهٔ حاضر نشان داد که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تیمار ۴، کاتالاز در تیمار ۳ و گلوتاتیون پراکسیداز در تیمارهای ۳ و ۴ افزایش یافتند. فعالیت این آنزیم‌ها در تیمار ۵ که با خوراک حاوی بالاترین سطح از کنجالهٔ کانولای تخمیری تغذیه شدند، نسبت به تیمار شاهد تغییرات معنی‌داری نداشت. در مورد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ماهیان تغذیه‌شده با منابع گیاهی، نتایج مختلفی گزارش شده است. در مطالعهٔ Lin و Luo در سال ۲۰۱۱ روی تیلاپیای دورگه (*Orechromis niloticus* × *Orechromis aureus*) با افزایش درصد کنجالهٔ سویای خوراک، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سرم ماهیان کاهش یافت. آن‌ها علت این کاهش را اختلال در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهیان تغذیه‌شده با پودر سویا در اثر وجود ترکیبات ضد تغذیه‌ای آن عنوان کردند. افزودن سویای هیدرولیز شده به خوراک ماهیان کفشک (*Platichthys stellatus*) در مطالعهٔ Song و همکاران (۲۰۱۴) منجر به افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز سرم شد. در این مطالعه افزایش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سرم ماهیان به خواص آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای پودر سویای هیدرولیز شده نسبت داده شد. استفاده از کنجالهٔ سویا در خوراک بچه‌ماهیان کپور طلایی دورگه در مطالعهٔ Zhu و همکاران (۲۰۲۰) تغییرات معنی‌داری را در فعالیت کاتالاز نشان نداد. سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز نیز در تیمارهایی که خوراک حاوی بالاترین سطح استفاده از کنجالهٔ سویا بود، افزایش یافتند. علت افزایش این آنزیم‌ها در سطوح بالای استفاده از سویا در خوراک ماهیان به تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در مواجهه با ترکیبات ضد تغذیه‌ای کنجالهٔ سویا نسبت داده شد. در مطالعهٔ حاضر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تیمارهای ۳ و ۴ را می‌توان به تلاش ماهی جهت حذف رادیکال‌های آزاد و در نتیجه خنثی‌سازی اثر ترکیبات ضد تغذیه‌ای خوراک نسبت داد (Rumley and Paterson, 1998). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اولین سد دفاعی در برابر تنش اکسایشی بوده و در مواجهه با اندک عوامل استرسی دچار تغییر می‌شود (Limon-Pacheco and Gonsebatt, 2009). گلوتاتیون پراکسیداز نیز آخرین آنزیمی است که وارد واکنش ضد اکسایشی می‌شود. با توجه به اینکه فعالیت مناسب این آنزیم نشان‌دهندهٔ توانایی لازم سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی موجود برای حذف زنجیرهٔ رادیکال‌های آزاد است، عدم تغییرات آن در تیمار ۵ مطالعهٔ حاضر احتمالاً سازگاری بچه‌ماهیان به شرایط را نشان می‌دهد (Schneider *et al*., 2005). سازگاری به شرایط باعث افزایش نسبت گلوتاتیون احیاء به اکسید در کبد ماهیان و سبب افزایش کمپلکس‌های زنجیرهٔ انتقال الکترون در میتوکندری و کاهش عوارض تنش اکسیداتیو می‌شوند. با کاهش استرس فعالیت آنزیم‌های مرتبط با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی نیز کاهش می‌یابد (Tian *et al*., 2014).

فعالیت آنزیم‌های متابولیک کبد ماهیان در مطالعهٔ حاضر نشان داد که آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در تمامی تیمارهای آزمایشی کاهش یافتند. البته این روند کاهشی در تیمار ۵ کمترین تغییرات را نشان داد. در مطالعهٔ Cheng و همکاران (۲۰۱۰) با افزایش سطوح کنجالهٔ کانولای خوراک، فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز کبد ماهیان باس ژاپنی (*Lateolabrax japonicus*) کاهش یافت. مشابه همین نتایج کاهش آنزیم‌های متابولیک کبد با افزایش سطح کنجالهٔ سویا در خوراک ماهیان تیلاپیای دورگه (*Orechromis niloticus* × *Orechromis aureus*) به‌دست آمد (Lin and Luo, 2011). در مطالعهٔ Zhu و همکاران (۲۰۲۰) نیز کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در

بالاترین سطح استفاده از کنجالهٔ سویا در خوراک بچه‌ماهیان کپور طلایی دورگه مشاهده شد. مشابه نتایج مطالعهٔ حاضر، در مطالعهٔ Yuan و همکاران (۲۰۱۹) فعالیت آنزیم‌های متابولیکی کبد ماهیان سیم وچانگ (*Megalobrama amblycephala*) تغذیه‌شده با خوراک حاوی بالاترین سطح کنجالهٔ پنبه‌دانهٔ هیدرولیز شده، مشابه تیمار شاهد بود. این آنزیم‌ها مهم‌ترین آمینوترانسفراز کبدی هستند که نقش مهمی در تشخیص آسیب‌های بافت کبد ایفا می‌کنند. تصور بر این است که افزایش فعالیت آنزیم‌های متابولیک در سرم نشانه‌ای از آسیب به کبد ماهیان است، اما افزایش این آنزیم‌ها در بافت کبد به کمبود اسیدهای آمینه خوراک نسبت داده می‌شود (Yuan *et al*., 2019). در مطالعهٔ Cheng و همکاران (۲۰۱۰) علت کاهش فعالیت آنزیم‌های آمینوترانسفراز کبد ماهیان، کمبود اسیدهای آمینه خوراک حاوی سطوح بالای کانولا عنوان شد. اسیدهای آمینه توسط آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز کاتابولیز شده و طی فرآیند کاتالیز برگشت‌پذیر به آلفا کتو اسید تبدیل می‌شوند. عدم توازن اسیدهای آمینهٔ خوراک، سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های متابولیکی کبد می‌شود (Lin and Luo, 2011).

نتیجه‌گیری نهایی

به‌طور کلی با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین بیان نمود که تخمیر کانولا توسط جنس باسیلوس با توجه به کاهش محتوای برخی از مواد ضد تغذیه‌ای و بهبود قابلیت هضم مواد مغذی آن، می‌تواند گزینهٔ مناسبی برای استفاده در خوراک آبزیانی چون ماهی تیلاپیا باشد. این عمل باعث کاهش قیمت تمام‌شدهٔ خوراک و همچنین رقابتی‌تر نمودن تولید آبزیان می‌شود. در این پژوهش استفاده از ۵۰ درصد کانولای تخمیرشده در خوراک ماهیان تیلاپیای نیل بر شاخص‌های رشد ماهیان اثر منفی نداشت.

۵. منابع

References

Akhlaghi, M., Mirab Brojerdi, M., 1999. Anesthetic effect of clove tree and LC50 determination in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Veterinary Research* 54(2), 49-52. (In Persian)

Alcaraz, L.D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L.E., Souza, V., Herrera-Estrella, L., Olmedo, G., 2010. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics* 11(1), 332. DOI: 10.1186/1471-2164-11-332

AOAC., 2005. Official methods of analysis of association of official agriculture chemists. 18th ed, Washington, Gaithersburg 25 p.

Burel, C., Boujard, T., Escaffre, A.M., Kaushik, S.J., Boeuf, G., Mol, K.A., van der Geyten, S., Kuehn, E.R., 2000. Dietary low-glucosinolate rapeseed meal affects thyroid status and nutrient utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition* 83(6), 653-664. DOI: 10.1017/s0007114500000830

Cheng, Z., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Ma, H., Li, Y., Zhang, J., 2010. Effects of dietary canola meal on growth performance, digestion and metabolism of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* 305(1–4), 102-108. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.03.031

De Boland, A.R., Garner, G.B., O'Dell, B.L., 1975. Identification and properties of phytate in cereal grains and oilseed products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23(6), 1186-1189. DOI: 10.1021/jf60202a038

El-Sayed, A.F.M., 2006. Tilapia culture. CABI Publishing, UK, 277 p.

Enami, H., 2011. A review of using canola/rapeseed meal in aquaculture feeding. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 6(1), 22-36. DOI: 10.3923/jfas.2011.22.36

Francis, G., Makkar, H.P., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199(3-4), 197-227. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00526-9

FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016.Contributing to food security and nutrition for all. Rome, 200 p.

Hamza, N., Mhetli, M., Ben, I., Cahu, C., Kestemont, P., 2008. Effect of dietary phospholipd levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Aquaculture* 275(1-4), 274-282. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.01.014

Li, M.H., Robinson, E.H., 1997. Microbial phytase can replace inorganic phosphorus supplements in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets 1. *Journal of the World Aquaculture Society* 28(4), 402-406. DOI: 10.1111/j.1749-7345.1997.tb00287.x

Lim, C., Webster, C.D., Lee, C.S., 2008. Alternative protein sources in aquaculture diets. Haworth Press New York 1st: 594 p.

Limon-Pacheco, J., Gonsebatt, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674(1-2), 137-47. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.015

Lin, S., Luo, L., 2011. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Animal Feed Science and Technology* 168, 80-87. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2011.03.012

Liu, B.L., Rafiq, A., Tzeng, Y.M., Rob, A., 1998. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme and Microbial Technology* 22(5), 415-424. DOI: 10.1016/S0141-0229(97)00210-X

Lucas, J.S., Southgate, P.C., Tucker, C.S., 2019. Aquaculture: farming aquatic animals and plants. Wiley-Blackwell, edition 3, 664.

Mahmoudikiya, Z., Imani, A., 2023. Introducing antinutritional factors in plant origin fish feed ingredients and strategies to reduce their contents. *Journal of Fisheries* 76(3), 377-396. (in Persian). DOI: 10.22059/jfisheries.2023.352551.1356

Mohammadi, M., Imani, A., Farhangi, M., Gharaei, A., Hafezieh, M., 2020. Replacement of fishmeal with processed canola meal in diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Growth performance, mucosal innate immunity, hepatic oxidative status, liver and intestine histology. *Aquaculture* 518, 734824. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734824

Mohseni, M., Ghorbanzadeh, F., Seyedalipour, B., 2018. Phytase production from rice bran extract using *Bacillus* spp. isolated from sediments of the Caspian Sea. *Journal of Cellular and Molecular Research* 30(4), 476-487. (in Persian) DOI: 20.1001.1.23832738.1396.30.4.6.1

Mohseni, M., Malekpour, M., 2019. Replacement of fish meal with canola meal and its effects on growth performance, digestion, indicas hematological and thyroid hormones level of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 27(5), 135-148. (in Persian) DOI: 10.22092/isfj.2019.118084

Mwachireya, S., Beames, R., Higgs, D., Dosanjh, B., 1999. Digestibility of canola protein products derived from the physical, enzymatic and chemical processing of commercial canola meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) held in fresh water. *Aquaculture Nutrition* 5(2), 73-82. DOI: 10.1046/j.1365-2095.1999.00089.x

NRC, National Research Council, 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academies Press, New York, USA.

Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70(1), 158-169. DOI: 10.5555/uri:pii:0022214367900765

Plaipetch, P., Yakupitiyage, A., 2012. Use of yeast-fermented canola meal to replace fishmeal in the diet of Asian sea bass *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Journal of Aquaculture Research and Development* 3(2), 1000125. DOI: 10.4172/2155-9546.1000125

Pourahad-Anzabi, M., Sarvi Moghanlou, K., Imani, A., Tahmasebi, R., 2023. The effect of a diet containing spoiled fish meal and the protective effects of vitamin E and C supplements on growth, hematological and biochemical indices of rainbow trout juveniles (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries* 76(2), 181-194. (in Persian). DOI: 10.22059/jfisheries.2023.351064.1351

Portz, L., Liebert, F., 2004. Growth, nutrient utilization and parameters of mineral metabolism in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fed plant-based diets with graded levels of microbial phytase. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 88(9-10), 311-320. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2004.00486.x

Przyby, A., Mazurkiewicz, J., Rozek, W., 2006. Partial substitution of fish meal with soybean protein concentrates and extracted rapeseed meal in the diet of sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Journal of Applied Ichthyology* 22(suppl. 1), 298-302. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2007.00973.x

Rodehutscord, M., Pfeffer, E., 1995. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Water Science and Technology* 31(10), 143-147. DOI: 10.1016/0273-1223(95)00433-N

Rumley, A.G., Paterson, J.R., 1998. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry* 35, 181–200. DOI: 10.1177/000456329803500202

Schneider, C.D., Barp, J., Ribeiro, J.L., Bello, K.A., Oliveira, A.R., 2005. Oxidative stress after three different intensities of running. *The Canadian Journal of Applied Physiology* 30,723-34. DOI: 10.1139/h05-151

Song, Z., Li, H., Wang, J., Li, P., Sun, Y., Zhang, L., 2014. Effects of fishmeal replacement with soy protein hydrolysates on growth performance, blood biochemistry, gastrointestinal digestion and muscle composition of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture* 426-427, 96-104. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.01.002

Tian, G., Sawashita, J., Kubo, H., Nishio, S. Y., Hashimoto, S., Suzuki, N., Yoshimura, H., Tsuruoka, M., Wang, Y., Liu, Y., Luo, H., Xu, Z., Mori, M., Kitano, M., Hosoe, K., Takeda, T., Usami, S., Higuchi, K., 2014. Ubiquinol-10 supplementation activates mitochondria functions to decelerate senescence in senescence-accelerated mice. *Antioxidants and Redox Signaling* 20(16), 2606-2620. DOI: 10.1089/ars.2013.5406

Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W.K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture* 1(1), 10-57. DOI: 10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74(10), 3583-3597. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2

Yamamoto, T., Iwashita, Y., Matsunari, H., Sugita, T., Furuita, H., Akimoto, A., Suzuki, N., 2010. Influence of fermentation conditions for soybean meal in a non-fish meal diet on the growth performance and physiological condition of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 309(1-4), 173-180. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.09.021

Yazdanparast, R., Bahramikia, S., Ardestani, A., 2008. *Nasturtioum officinale* reduces oxidative stress and enhances hyper cholesterolaemic rats. *Chemico- Biological Interactions* 172, 176-184. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.01.006

Yuan, X.Y., Liu, M.Y., Cheng, H.H., Huang, Y.Y., Dai, Y.J., 2019. Replacing fish meal with cottonseed meal protein hydrolysate affects amino acid metabolism via AMPK/SIRT1 and TOR signaling pathway of *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture* 510, 225-233. DOI: 10.1155/2023/8347921

Zhou, Q. L., Habte-Tsion, H. M., Ge, X., Xie, J., Ren, M., Liu, B., Pan, L., 2018. Graded replacing fishmeal with canola meal in diets affects growth and target of rapamycin pathway gene expression of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture Nutrition* 24(1), 300-309. DOI: 10.1111/anu.12560

Zhu, R., Li, L., Li, M., Yu, Z., Wang, H., Wu, L., 2020. The effects of substituting fish meal with soy protein concentrate on growth performance, antioxidant capacity and intestinal histology in juvenile golden crucian carp, *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*. *Aquaculture Reports* 18, 100435. DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100435